

SELECTIVE IMMUNE ENHANCER

Patent number: JP55087724
Publication date: 1980-07-02
Inventor: KONISHI JINEMON
Applicant: NIPPON ZOKI PHARMACEUTICAL CO
Classification:
- international: A61K35/76
- european:
Application number: JP19780163319 19781227
Priority number(s): JP19780163319 19781227

Report a data error here

Abstract of JP55087724

PURPOSE:A selective immune enhancer effective against various diseases, capable of improving the ability to produce IgG and IgM specifically without affecting the IgE production, comprising a specific substance, obtained by inoculating vaccinia virus into smallpoxed tissues, as an active constituent. **CONSTITUTION:**The enhancer comprising a substance having the following properties as an active constituent: Brown amorphous hygroscopic powder. Solubility: soluble in water, methanol, and ethanol. Ultraviolet spectrum: $\lambda_{\text{max}}=255-275\text{nm}$. Ninhydrin reaction: Positive; precipitation by silver nitrate reagent; Various protein detection reaction: negative. The substance is obtained by inoculating vaccinia virus into tissues of various animals, cultured cells or tissues, and by extracting the active constituent. Said substance enhances only the ability to produce immune antibody of IgM and IgM specifically with low toxicity, and is useful as treating agents for various infectious diseases, malignant tumors, adjuvants, and preventives.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭55—87724

⑪ Int. Cl.³
A 61 K 35/76識別記号
A B D庁内整理番号
6617—4C

⑬ 公開 昭和55年(1980)7月2日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 6 頁)

⑭ 選択的免疫促進剤

武蔵野市吉祥寺東町3丁目21番
13号

⑮ 特 願 昭53—163319

⑯ 出 願 人 日本臓器製薬株式会社

⑰ 出 願 昭53(1978)12月27日

大阪市東区平野町2丁目10番地

⑱ 発 明 者 小西甚右衛門

⑲ 代 理 人 弁理士 夢優美 外1名

明 細 書

1 発明の名称

選択的免疫促進剤

2 特許請求の範囲

(1) 次の物理化学的性質:

- ① 性状: かつ色無定形の吸湿性粉末
- ② 溶解性: 水、メタノール、エタノールに可溶
- ③ 紫外部吸収: λ_{max} 255—275 nm
- ④ ニンヒドリン反応: 陽性
- ⑤ 本発明物質2gをとり、過塩素酸1mlを加え、液が無色となるまで加熱し、希硫酸3ml、塩酸アミドール0.4gおよび亜硫酸水素ナトリウム8gに水100mlを加えて溶かした液2ml、モリデン酸アンモニウム1gに水30mlを加えて溶かした液2mlを加え放置するとき、液は青色を呈し、
- ⑥ 本発明物質5gをとり、水を加えて溶かし10mlとし、この液1mlに、オルシン0.2gおよび硫酸第二鉄アンモニウム0.135

gにエタノール5mlを加えて溶かし、この液を塩酸83mlに加え、水を加えて100mlとした液3mlを加え沸騰水浴中で加熱するとき、液は緑色を呈し、

⑦ 本発明物質の水溶液は硝酸銀試薬で沈殿を生じ、そして

⑧ 本発明物質に対する各種蛋白検出反応は陰性である、

を有する物質を有効成分とする選択的免疫促進剤。

3 発明の詳細な説明

本発明は動物免疫組織より得られる特定物質を有効成分とする免疫促進剤に関する。

従来免疫促進物質として例えばBCG、溶連菌等の細菌、細菌々体成分、ある種のカタラク菌糸体抽出成分、ポリスクレオチド、レバミゾール多糖類、その他が知られている。免疫促進物質はウイルス性疾患、細菌性疾患および特に各種癌の治療に、それ自体であるいは他の薬剤ならびに治療法と併用して応用

し得るものと期待されている。しかし現在特に有効な免疫促進物質は知られていない。

本発明者はワクシニアウイルスを接種し、発症させた各種動物組織、培養細胞、もしくは培養組織（以下これらを単に発症組織と呼ぶ）を処理して抽出した物質につき研究した結果、該物質が生体の免疫グロブリンG（以下IgGと呼ぶ）、免疫グロブリンM（以下IgMと呼ぶ）の産生を選択的に促進し、免疫グロブリンE（以下IgEと呼ぶ）の産生に対し実質的に影響を与えないことを見出した。本物質はIgGおよびIgMの免疫抗体産生能を特異的に高めかつアトピー性疾患惹起抗体であるIgEの産生には無影響ないし抑制的傾向を示すため、生体に投与した場合好ましい選択的免疫促進作用を示しかつ毒性が極めて低く、生体の異物に対する防禦力および自然治癒力を回復、増強するので、各種感染症および悪性腫瘍の治療剤、治療補助剤ならびに予防剤として、また悪性腫瘍等術後、免疫能低下の回復促進および病後の自然治癒力回復

(3)

のウイルス感染炎症組織または分化鶏卵の漿尿膜等である。

前記工程(c)で用いる鉱酸としては、塩酸、硫酸、臭化水素酸等をあげることができる。また吸着剤としては活性炭、カオリン、イオン交換樹脂をあげることができる。

工程(d)で用いられる溶出溶媒としては水、メタノール、エタノール、イソプロパノール等があり、またこれ等の適当な混合溶液を使用することもできる。

前記操作によつて抽出、精製された本発明有効成分は、以下の物理化学的性質を有する：

- ① 性状：かつ色無定形の吸湿性粉末
- ② 溶解性：水、メタノール、エタノールに可溶
- ③ 紫外線吸収： λ_{max} 255-275 nm
- ④ ニンヒドリン反応：陽性
- ⑤ 本発明物質2gをとり、過塩素酸1mlを加え、液が無色となるまで加熱し、希硫酸3ml、塩酸アミドール0.4gおよび亜硫酸水素ナト

(5)

促進剤として有用である。

本発明の免疫促進物質有効成分は以下の工程で抽出される。

- (a) 無菌的に採取した発症組織を磨碎しその1-5倍量のフェノール加グリセリン水を加え乳状とした後、濾過または遠心分離することによつて赤かつ色の液体を得る。
- (b) 前記液体を等電点付近のpHに調整して加熱し、除蛋白した後ザイン濾過板を用いて濾過する。
- (c) 前記濾液を弱アルカリ性として煮沸した後、濾過し鉱酸で弱酸性とした後適当な吸着剤に吸着させる。
- (d) 前記吸着剤に水または有機溶媒を加えて溶出し、溶出液を減圧下に蒸発乾固または凍結乾燥することによつて、かつ色の目的物質を得る。

本発明において発症組織とは、ワクシニアウイルスの各種接種方法又は培養方法にて得たウイルス感染培養組織、培養細胞および各種動物

(4)

リウム8gに水100mlを加えて溶かした液2ml、モリブデン酸アンモニウム1gに水30mlを加えて溶かした液2mlを加え放置すると液は青色を呈し、

- ⑥ 本発明物質5gをとり、水を加えて溶かし10mlとし、この液1mlに、オルシン0.2gおよび硫酸第二鉄アンモニウム0.135gにエタノール5mlを加えて溶かし、この液を塩酸83mlに加え、水を加えて100mlとした液、3mlを加え沸騰水浴中で加熱するとき、液は緑色を呈し、

- ⑦ 本発明物質の水溶液は硝酸銀試薬で沈澱を生じ、そして

- ⑧ 本発明物質に対する各種蛋白検出反応は陰性である。

以下本発明の抽出法の実施例である。

但し、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

実施例 1

健康な成熟家兎の皮膚にワクシニアウイルス

(6)

を接種し発痘させた後、発痘した皮膚を無菌的に別出し、これを細切した後フェノール加グリセリン水を加え、ホモゲナイザーで磨砕し乳状とする。次いでこれを遠心濾過し、得られた濾液を塩酸で pH 4.8 - 5.5 とし、流通蒸気にて 100℃ に加熱し、濾過する。濾液はさらにザイツ濾過板を用いて濾過した後水酸化ナトリウムで pH 9.2 とし、さらに 100℃ に加熱した後、濾過する。濾液を塩酸で pH 4.5 とし、活性炭 1.5 g を加え、1 - 5 時間攪拌した後濾過する。この活性炭に水を加え、水酸化ナトリウムで pH 9.4 - 10 とし、3 - 5 時間攪拌した後濾過する。濾液を塩酸で pH 7.0 - 7.2 とし、減圧下に乾固する。発痘皮膚 1 kg からの収量は 1.5 - 2 g であつた。

実施例 2

実施例 1 と同様にして得た吸着活性炭にメタノールを加え、1 時間攪拌した後濾過する。減圧下に乾固して有効成分を得る。発痘皮膚 1 kg からの収量は 4 - 6 g であつた。

(7)

D (以下 CP と呼ぶ) 10 mg/kg をそれぞれ 1 群 6 匹のマウスに 5 日間投与し、免疫後 3, 5 および 7 日目に脾臓の溶血斑形成細胞数を測定した。結果を第 1 図に示す。本発明組成物投与群の免疫後 5 日目の溶血斑形成細胞数は第 1 図中に * (P < 0.05) および ** (P < 0.01) のマークで示す通り、対照群に比して有意に増加し、本実験より本発明物質が IgG および IgM の産生を促進することが判明した。

(b) IgE 産生試験

ラット (ウィスター系) を抗原 (ブタ回虫抽出蛋白質にジニトロフェニル基を結合させたもの) と百日咳ワクチンで免疫した後、本発明物質 10 mg/kg、20 mg/kg および 50 mg/kg をそれぞれ 1 群 8 匹、CP 10 mg/kg を 1 群 4 匹に 5 日間投与し、9 日目に採取した血清中の IgE 量を 48 時間ホモ PCA (受動的皮膚アナフィラキシー) 反応で測定した。結果を第 2 図に示す。

(9)

本発明物質の薬理作用について次の試験を行ない、その結果を後にまとめた。

(I) 急性毒性試験

各群 10 匹のマウスを用いて、本発明物質の急性毒性試験を行なった。その結果を次の第 1 表にまとめる。

第 1 表

	LD 50 (mg/kg)		
	p. o	i. p	i. v
本発明物質	> 4,800	1,230	530

(II) 薬理試験

(1) 免疫促進作用

(a) 溶血斑形成細胞 (HPFC) 産生試験

カンニングガム (A. J. Cunningham; Nature, 207, 1106-1107 (1965)) の方法によりマウス (DDY 系) をヒンジ赤血球で免疫した後本発明物質 5 mg/kg および 10 mg/kg および免疫抑制剤シクロフオスファミ

(8)

CP 投与群の血清中 IgE 量 (PCA 力価) は、第 2 図中に ** (P < 0.01) のマークで示す通り対照に比して有意に減少したが、本発明組成物投与群では対照に比して統計学的差異が認められず、本実験により本発明物質が IgE の産生を促進しないことが判明した。

本発明物質を活性成分として含有する薬剤は例えば錠剤、カプセル、顆粒剤、注射剤、液剤、座剤の形態とすることができる。

錠剤、カプセル、顆粒剤を製造するための製剤組成物として例えばゲンブソ、乳糖、マンニトール等の賦形剤、微結晶セルロース、メチルセルロース、その他のセルロース誘導体、アラビアゴム、ゼラチン、ポリエチレン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン等の結合剤、グリセロール等の湿潤剤、カルボキシメチルセルロース、微結晶セルロース、ポリエチレングリコール等の崩壊剤、セチルアルコール、グリセ

リン、脂肪酸エステル類等の界面活性剤、タルク、ステアリン酸マグネシウム、カルシウム、固体ポリエチレングリコール等の滑沢剤、その他被覆剤、着色剤、矯味矯臭剤などがあげられる。

注射剤を製造するための製剤組成物としては注射用蒸留水、生理食塩水、5-20%ブドウ糖注射液、注射用植物油、エタノール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール類等の溶剤、ピロ亜硫酸ナトリウム、酸化水素ナトリウム、L-アスコルビン酸、チオグリコール酸、クエン酸塩、酢酸塩、リン酸塩等の安定剤、塩酸プロカイン、ブドウ糖等の無痛化剤、その他等張化剤、溶解補助剤、保存剤、懸濁化剤、乳化剤などがあげられる。注射用組成物は無菌の溶液、懸濁液、乳濁液もしくは使用時溶剤に溶解して用いる剤型とすることができる。

坐剤を製造するための製剤組成物は 카카오脂、ラウリン脂、グリセロセラテン、マ

クロゴール、Wilexol (登録商標、ダイナマイト・ノベル A. G.) 等の基剤および界面活性剤、保存剤などがあげられる。

本発明物質は錠剤、カプセル等の形で経口的に、注射剤の形で非経口的におよび坐剤の形で経直腸的に投与される。

本発明物質の1日投与量は0.01g/kgないし10g/kgが一般的であるが、疾患、症状の程度により適宜変更することができる。

本発明物質を活性成分として含有する薬剤の処方例を以下に示すが、これ等に限定されるものではない。

処方例 1 (全重量450gの錠剤)

本発明物質	100g
乳糖	250g
結晶セルロース	80g
ステアリン酸マグネシウム	20g
計	450g

処方例 2 (充満物重量230gのカプセル)

ル)

本発明物質	10g
乳糖	135g
バレイショデンプン	50g
ステアリン酸マグネシウム	5g
タルク	10g
計	230g

処方例 3 (容量1mlの注射用アンプル)

本発明物質	1g
注射用蒸留水	適量
計	1ml

処方例 4 (全量2gの坐剤)

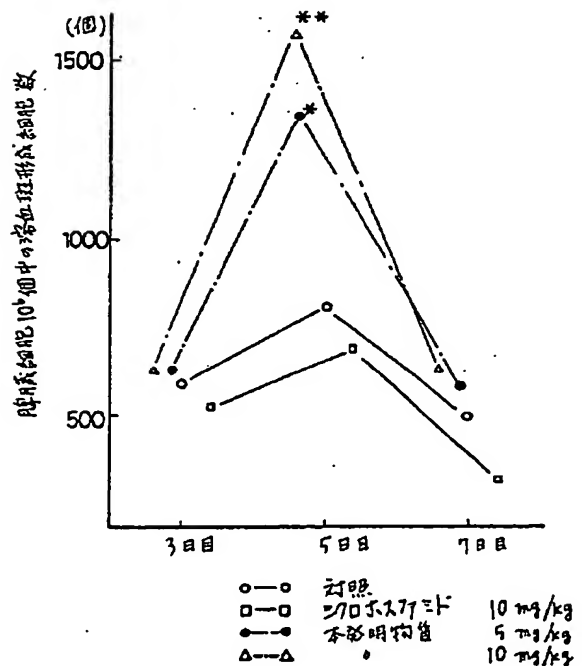
本発明物質	20g
カカオ脂	1980g
計	2000g

4 図面の簡単な説明

第1図は本発明物質の溶血斑形成細胞産生におよぼす影響を示すグラフ。

第2図は本発明物質の48時間ホモPCA反応におよぼす影響を示すグラフである。

図1



手 続 補 正 書

昭和 55 年 3 月 25 日

特許庁長官 一審判決

1. 事件の表示 昭和 53 年 特 許 願 第 163319 号

2. 発明の名称 選択的免疫促進剤

3. 補正する者

事件との関係 特許出願人

名 称 日本薬器製薬株式会社

4. 代 理 人

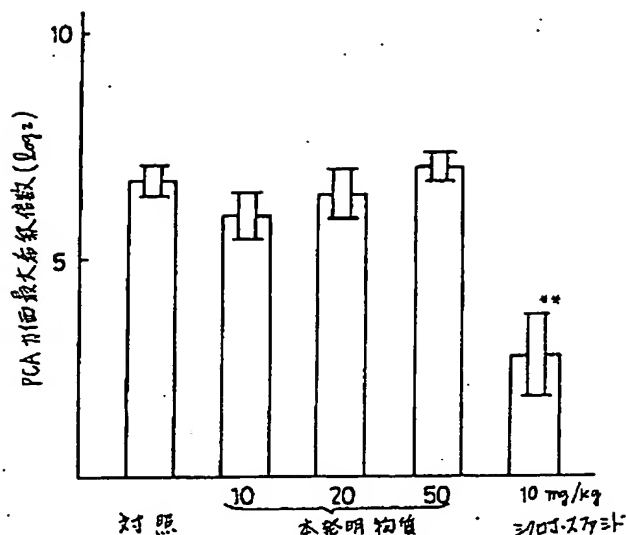
住 所 東京都千代田区神田駿河台1の6、主理の友ビル

氏 名 (6271) 専 優 美 (ほか 1 名)

5. 補正命令の日付

昭和 年 月 日 「自発」

6. 補正の対象

(図面の簡単な説明欄)
明細書の発明の詳細な説明の欄および図面

7. 補正の内容

- (1) 明細書第 9 頁第 10 行と第 11 行の間に下記の語を挿入する。

「また、ヒツジ赤血球による免疫の 2 日及び 1 日前に CP 25mg/kg を投与したマウスについて、本発明物質の効果を調べた。結果を第 2 図に示す。本発明物質 5mg/kg の投与によつて、CP により抑制された免疫反応が、3 日目及び 7 日目に有意に ($P < 0.05$) 回復した。」

- (2) 同第 9 頁末行、第 10 頁第 2 行、第 13 頁下から 2 行の「第 2 図」を「第 3 図」と補正する。

- (3) 同第 13 頁下から 3 行と 2 行の間に下記の語を挿入する。

「第 2 図はシクロホスファミドで前処置した場合の本発明物質の溶血凝形成細胞産生におよぼす影響を示すグラフ、」

- (4) 同第 13 頁下から 2 行～1 行の「48 時間ホモ PCA 反応」を「I/E 産生」と補正する。

- (5) 同第 10 頁第 7 行と第 8 行の間に下記の内容を挿入する。

(2)

「(2) 抗癌作用

1 群 10 匹のウイスター系ラットを用いて、3-メチル-ジエチルアミノアジベンゼン (以下 DAB と呼ぶ) による肝細胞癌への本発明物質の効果を調べた。DAB は飼料に 0.06% 混入させて与えた。DAB 投与によつて 12 週には癌形成結節が著しくなり、以降 DAB 投与を中止した際にも、引き続き投与した場合にも 26 週までには著名な肝腫大を伴つた肝細胞癌あるいは混合型肝癌が出現した。

DAB 投与を 12 週で中止し、13 週より 26 週まで本発明物質 48mg/kg 宛、週 5 日腹腔内投与した群では、26 週まで全く癌腫の形成が認められなかった。尚、一部を 27 週以降再度本発明物質の投与を中止し観察したが、31 週まで癌腫の発現はなかった。13 週以降本発明物質を DAB と同時投与した群では、10 匹中 4 匹に癌腫の発現がみられず、死亡例は皆無であつた。また、試験開始より同時投与した群では、癌化を完全に抑制し健常と同一であつた。

(3)

(3) 肝硬変抑制作用

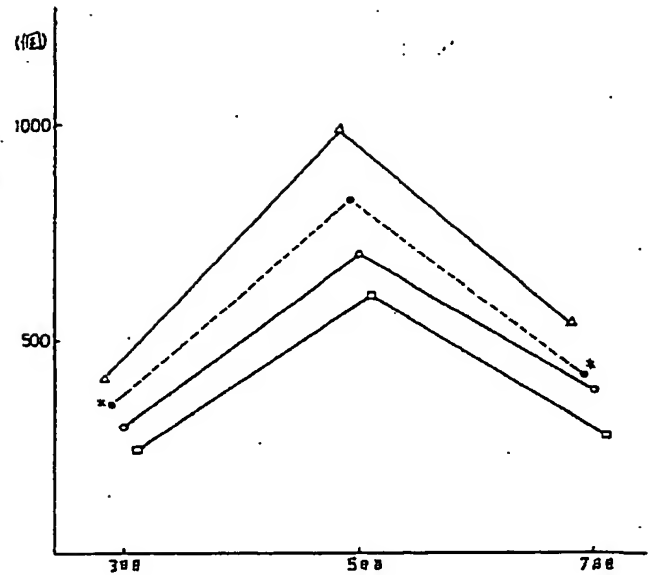
1群10匹のクイスター系ラットを用いて、四塩化炭素 (CCl₄) によつて誘起される肝硬変に対する本発明物質の効果を調べた。

CCl₄ は同量のオリーブ油を混合したものを 10ml/kg、週2回、15週皮下投与し、本発明物質は 48mg/kg 宛、週5回腹腔内投与した。対照群では15週に著大な偽小葉の形成や腹水の貯留など完成した肝硬変の所見を呈したが、本発明物質を CCl₄ と同時に投与した群では著変なく、肝硬変の像は全く抑えられていた。」

(6) 現「第2図」を「第3図」と補正する。

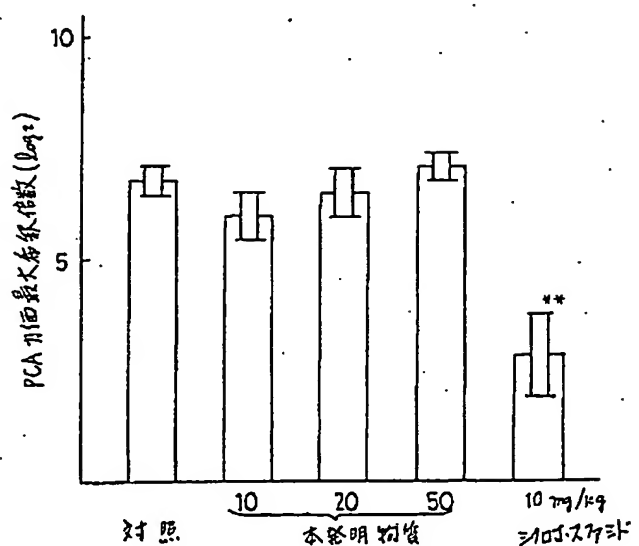
(第2図を別紙に朱記したとおり補正する。)

(7) 新たに第2図を提出する。

肝臓細胞10⁵個中の過塩素酸染色細胞数

○—○ 対照
□—□ シロホスフィド 25mg/kg
●---● シロホスフィド 25mg/kg + 本発明物質 5mg/kg
▲—▲ 本発明物質 10mg/kg

(4)

第3図
~~第2図~~

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.